Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen-Institut
der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen
Direktor: Professor Dr. E. Roots

Das biologische Verhalten einiger „Pullorum"-Stämme, die das Teil-Antigen XII_2 nicht oder nur in sehr geringer Menge besitzen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktor-Grades

der

Veterinär-Medizinischen Fakultät

der

Justus Liebig-Hochschule

zu Gießen

eingereicht von

Wilhelm Strack

Tierarzt aus Egenroth (Untertaunus)

Gießen 1953

Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen-Institut
der Justus Liebig-Hochschule zu Gießen
Direktor: Professor Dr. E. Roots

Das biologische Verhalten einiger „Pullorum"-Stämme, die das Teil-Antigen XII_2 nicht oder nur in sehr geringer Menge besitzen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktor-Grades
der
Veterinär-Medizinischen Fakultät
der
Justus Liebig-Hochschule
zu Gießen

eingereicht von

Wilhelm Strack
Tierarzt aus Egenroth (Untertaunus)

Gießen 1953

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät Gießen

Dekan: Prof. Dr. A. Hemmert-Halswick

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Roots

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1952

von Münchowsche Universitätsdruckerei Wilhelm Schmitz in Gießen

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
I. Einleitung	4
II. Schrifttum	4
III. Eigene Untersuchungen	6
1. Das Untersuchungsmaterial	6
2. Die Untersuchungsmethodik	6
a) Versuchs-Nährböden	7
b) Versuchs-Anordnung	7
c) Versuchs-Reihen	8
3. Die Untersuchungsergebnisse	9
IV. Besprechung der Ergebnisse	12
V. Zusammenfassung	13
VI. Schlußfolgerungen	14
VII. Literaturverzeichnis	15
Lebenslauf	16

I. Einleitung.

Nachdem in letzter Zeit sowohl der epizootiologische Zusammenhang zwischen Kükenruhr und Hühnertyphus als auch die bakteriologische Untersuchung des dabei beteiligten Bakteriums keine art-trennenden Merkmale der aus Fällen von Kükenruhr und Hühnertyphus gezüchteten Krankheitskeime hatten erkennen lassen, ist die Einheit beider Erreger fast allgemein anerkannt.

In neuester Zeit wurde nun durch quantitative Messungen der Teilfaktoren des O-Antigens XII eine serologische Trennung in „Pullorum"-Stämme vorgenommen, die das Partial-Antigen XII_2 entweder reichlich oder sehr wenig bzw. gar nicht besitzen. Die Bedeutung dieser neuesten Forschung für die praktische Bekämpfung der Seuche ist zweifellos sehr groß. Darüber hinaus erhebt sich die Frage, ob die früher als arttrennend bewerteten biologischen mit jenen serologischen Eigenschaften parallel verlaufen. Die Überprüfung dieser Sachlage habe ich auf Anregung von Herrn Professor Dr. Roots übernommen.

II. Schrifttum.

Klein (1889) hat das „Bacterium gallinarum" als Ursache einer „infektiösen Hühner-Enteritis" erstmalig beschrieben. Moore (1895/96) hat dieselbe Krankheit als „infektiöse Leukämie des Geflügels" in USA festgestellt und den Erreger „Bacterium sanguinarium" genannt. Curtice (1901) bezeichnete die Krankheit als „Fowl typhoid", Lignières und Zabala (1905) als „Salmonellose aviaire". Pfeiler und Rhese (1913) beschrieben die Seuche als „Hühner-Typhus", die durch das „Bacterium typhi gallinarum alcalifaciens" veranlaßt wurde.

Die Identität der angeführten Bakterien und damit auch der Krankheiten wurde bald erkannt (Smith und Ten Broeck 1914/15, Mulsow 1919, Pfeiler 1921).

Unabhängig hiervon stellte Rettger (1899/1900) in den USA eine mit weißen Durchfallsmassen einhergehende, hochinfektiöse und tödlich verlaufende Krankheit bei Küken fest; er nannte den Erreger „Bacterium pullorum". Die Infektion vom Brutei her wurde von Rettger und Harvey (1908) erkannt. Jones (1911/12) ergänzte diese Beobachtung dahin, daß auch erwachsene Hühner an dieser „Pullorum"-Infektion erkrankten und das Blut solcher Tiere die Bakterien agglutinierte.

Nach diesen Ergebnissen lag es nahe, einen Vergleich zwischen den bisher als getrennte Arten geführten Erregern des Hühnertyphus und der Kükenruhr vorzunehmen. Serologische Identität bzw. Verwandtschaft wurde festgestellt von Smith und Ten Broeck (1914/15), Rettger und Koser (1916/17), Mulsow (1919) u. a. Gewisse kulturelle Unterschiede wurden noch aufrecht erhalten, von denen namentlich die Gasbildung aus vergärbaren Kohlehydraten und die Vergärung von Maltose, Dextrin und Dulzit anzuführen sind. Das

Bacterium gallinarum sollte niemals Gas, das Bacterium pullorum regelmäßig Gas bilden. Die Vergärung der drei angeführten Kohlehydrate sollte dem Bacterium gallinarum eigen sein und dem Bacterium pullorum fehlen.

Mit diesen Fragen haben sich in der Folgezeit eine Reihe von Autoren befaßt, die überwiegend nachwiesen, daß diese Merkmale inkonstant sind, sich also zu einer Arttrennung nicht eignen (Manninger 1921/1927, Beller 1926/1928, Klimmer und Haupt 1927, Haupt 1928, Lerche 1928, Wynohradnik 1940). So wurde die Dextrin-Spaltung als Unterscheidungsmittel überhaupt verlassen (Gressel 1928, Günther 1930). Bei der Uneinheitlichkeit der Handels-Dextrine erscheint dies berechtigt (Haupt 1928). Maltose wird allgemein für die Unterscheidung von Bakterien, insbesondere innerhalb der Salmonella-Gruppe, als unsicher bezeichnet (Bader 1950). Bekannt ist z. B. eine verspätete Maltose-Vergärung des bei einer „Fleisch-Vergiftung" in Duisburg von Müller (1933) isolierten Gallinarum-Stammes (Kauffmann 1934). Von Interesse ist ferner, daß das von Hadley beschriebene, maltose-spaltende „Bacterium Jeffersoni" nach den Untersuchungen von John-Brooks und Rhodes (1923) eine R-Dissoziante des Bacterium gallinarum darstellt. Dulzit wird bei Weiterzüchtung im Laboratorium für Pullorum-Stämme angreifbar (Manninger 1927).

Vorübergehend wurde die Einordnung dieser Erreger in die Gattung Salmonella in Frage gestellt. Bergey (1925) stellte das Bacterium gallinarum in die Gattung Eberthella, d. h. neben das Typhus-Bakterium, Miessner (1927) und Gressel (1928) in die Gattung Shigella, d. h. neben das Dysenterie-Bakterium als „Bacterium paradysenteriae gallinarum".

Das Ergebnis dieser langwierigen Untersuchungen kann dahin zusammengefaßt werden, daß die Erreger von Hühnertyphus und Kükenruhr einer Art zuzurechnen sind, die den Namen Salmonella gallinarum führt. Wenn mitunter beide Namen (Salmonella gallinarum-pullorum) angewendet werden, kann dies nur damit begründet werden, daß ein Internationaler Geflügelkongreß (Carls 1950) die Krankheit offiziell als „Pullorum-Infektion" bezeichnete.

Im Zuge sero-analytischer Untersuchungen hatten zunächst Almon und Stovall 1939 bei einem Typhus-Stamm „T_2" festgestellt, daß die O-Antigene nicht vollwertig waren. Sie vermuteten einen Mangel an Antigen IX. Kauffmann (1940) aber erkannte, daß das Antigen XII aufspaltet (XII_1, XII_2 und XII_3) und das Teilantigen XII_2 nicht vorhanden ist. Durch Absättigungsversuche (Younie 1941, Edwards und Bruner 1946/48, Wright und Edwards 1948) wurde festgestellt, daß bei verschiedenen Stämmen der Salmonella gallinarum das Teil-Antigen XII_2 in differenten Mengen auftrat. Es war möglich, XII_2-reiche (sogenannte „X"- oder „Variant"-) Stämme von XII_2-armen (sogenannten „Standard"-) Stämmen (Younie 1941) zu unterscheiden. Für die sichere Erkennung gallinarum-infizierter Hühner wurde nach diesen Ergebnissen die Verwendung von Agglutinations-Antigenen erforderlich, die die beiden dominierenden Partial-Antigene XII_2 und XII_3 in ausreichenden Mengen enthalten, sonst können Infektionen von Hühnern mit einem „Standard"- oder „X"-Stamm unerkannt bleiben (Roekel 1949).

In Bergey's Manual (1948) wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die XII_2-reichen Typen der Salmonella pullorum zugehören, während Salmonella gallinarum anscheinend das Teil-Antigen XII_2 nicht enthält. Nach diesen Angaben erschien es angezeigt, XII_2-arme und XII_2-reiche Stämme der Salmonella gallinarum auf die biologischen Merkmale zu prüfen, die früher als arttrennend angegeben worden waren.

III. Eigene Untersuchungen.

1. Das Untersuchungsmaterial

Aus der Bakterien-Sammlung des Institutes standen für meine Untersuchungen 14 „Pullorum"-Stämme zur Verfügung, von denen je 7 serologisch XII_2-arm (Stamm 21, 244, 411, 1575, 4780, 270/51, 278/51) bzw. XII_2-reich (Stamm 52, 364, 399, 1161, 1165, 274/51, 430/51) waren. Die serologische Überprüfung der Stämme erfolgte mit einem XII_2-Faktorenserum, das aus einem gewöhnlichen Gallinarum-Antiserum (IX, XII_1, XII_2, XII_3) durch Absättigung mit Salmonella typhosa, Stamm T_2 (IX, XII_1 ... XII_3), erhalten wurde. Der Stamm 274/51, der bei der Isolierung in S- und R-Form wuchs, wurde mit beiden Formen in die Versuchsreihen aufgenommen. — Eine kulturell-biochemische Untersuchung der Stämme war bisher nicht durchgeführt.

Alter und Herkunft der Stämme war sehr verschieden. (Siehe Tabelle Seite 10). Zu einem Teil (Stamm 21, 52) handelt es sich um alte Laboratoriums-Stämme aus dem ehemaligen Reichsgesundheitsamt, ein anderer Teil (Stamm 1575, 4780, 1161, 1165) entstammt den Arbeiten von Carls (1949/50) und der Rest (Stamm 244, 411, 270/51, 278/51, 364, 399, 274/51 S und R, 430/51) wurde 1948/49 bzw. 1951 aus anfallendem Seuchenmaterial isoliert. Bei 6 von den 7 XII_2-armen Stämmen ist die Herkunft bekannt. Die Stämme 1575 und 4780 wurden aus getöteten, serologisch-reagierenden Hennen, die Stämme 244, 411, 270/51 und 278/51 aus verendeten Küken gezüchtet. Von den 7 XII_2-reichen Stämmen sind vier (Stamm 399, 1161, 1165, 274/51 S und R) aus verendeten Hennen bzw. Hähnen, zwei (Stamm 364, 430/51) aus verendeten Küken isoliert; die Herkunft des Stammes 52 ist unbekannt.

2. Die Untersuchungsmethodik

Die 14 Stämme sollten auf Gasbildung aus vergärbaren Kohlehydraten sowie auf Säurebildung aus Maltose, Dextrin und Dulzit untersucht werden, wobei darauf zu achten war, daß die serologische Eigenschaft auch am Ende des Versuches noch erhalten war.

Die theoretische Grundlage für diese biologische Untersuchung ist in der Tatsache gegeben, daß die Bakterien Enzyme produzieren bzw. besitzen, die imstande sind, die dargebotenen Nährstoffe zu verändern, zu spalten oder zu höheren Verbindungen aufzubauen. Nach Jordan und Burrows (1949) unterscheidet man

1. constituitive Bakterien-Enzyme, deren Produktion von der Zusammensetzung des Nährmediums unabhängig ist;
2. adaptive Enzyme, die nur in Gegenwart zugehöriger spezifischer Nährstoffe gebildet werden können, also eine Anpassung an diese darstellen und bei deren Fehlen nicht entstehen.

Die bakteriellen Gärprozesse kommen durch das Zusammenwirken von Esterasen, Carbohydrasen und Redoxasen zustande (Hallmann 1950) und sind in ihren Zwischenstufen mehr oder weniger erforscht (Leinbrock 1943, Jordan und Burrows 1949). Die Säurebildung stellt demnach einen Reduktions-Oxydations-Prozeß dar, bei dem eine Gas-Abspaltung von H_2 und CO_2 (durch eine Decarboxylase) auftritt oder unterbleibt.

In der bakteriellen Diagnostik wird im allgemeinen nur die Feststellung der Stoffwechsel-Endprodukte ins Auge gefaßt, wenn auch bei feineren Untersuchungen der Nachweis von Zwischen-Produkten angestrebt wird. Während die Lebensäußerungen der Mikroorganismen, die sich an N-haltigen Nährsubstraten abspielen, nur ausnahmsweise zur Differenzierung herangezogen werden, ist dies für das bakterielle Spaltungs-Vermögen von Kohlehydraten

im weitesten Sinne üblich geworden. Voraussetzung ist ein Grundnährboden, der eine Gärleistung der Bakterien ermöglicht, aber selbst keine vergärbaren Kohlehydrate enthält. Diesem Grundsubstrat werden jeweils einzelne Kohlehydrate zugesetzt. Nachgewiesene Spaltprodukte können dann eindeutig auf die Zerlegung dieses Zusatzes bezogen werden. Zum Nachweis dieser Abbauprodukte werden Säure-Alkali-Indikatoren (z. B. Bromthymolblau), zum Nachweis des gebildeten Gases das bekannte Durham-Röhrchen verwendet.

Für besondere Fälle können auch Minimal-Nährböden herangezogen werden. Sie enthalten eine zum Wachstum ausreichende N-Quelle, aber keine C-Quelle; nachträglich wird der vergärbare Zucker oder Alkohol zugesetzt. Es ist möglich, daß zwischen beiden Verfahren Unterschiede auftreten, d. h. daß in diesem Minimal-Nährboden u. U. ein Kohlehydrat gespalten wird, das im Vollnährboden nicht angegriffen wird.

Für meine Versuche benutzte ich ausschließlich Vollnährböden als Grundlage der Gärversuche.

a) Versuchs-Nährböden

Als Grundsubstrat verwendete ich

1. flüssige Nährböden:
   a) 1%ige Lösung von Trypto-Pepton aus Fleisch/Merck.
   b) 1%ige Lösung von Brunnengräber-Pepton.
   Beiden Lösungen wurde 0,3% NaCl und 0,2% Na_2HPO_4 zugesetzt.
   c) Serum-Wasser: 1 Teil Pfd.- oder Ri-Serum zu 4 Teilen Aqua dest.
2. feste Nährböden:
   a) 1%igen Trypto-Pepton-Agar (Trypto-Pepton aus Fleisch/Merck 1%, NaCl 0,3%, Na_2HPO_4, 0,2%, Aagar 1,5%).

Als Indikator wurde allen Nährböden 1% einer 1,5%igen alkoholischen Lösung von Bromthymolblau zugesetzt; pH = 7,0. Die flüssigen Nährböden waren in Reagenzgläsern außerdem mit Durham-Röhrchen beschickt. Die angeführten Nährböden wurden mit 0,5% der folgenden Kohlehydrate versetzt: Maltose, Dextrin oder Dulzit, sowie Glucose, Lactose, Mannit, Sorbit, Arabinose, Rhamnose oder Xylose. Die Sterilisation wurde so durchgeführt, daß nach dem Zusatz der Kohlehydrate nur eine kurzfristige Erhitzung auf 100° C nötig war (Hallmann 1950).

Die Prüfung der Stämme auf NH_4-Nährböden nach Hohn und Herrmann (Minimal-Nährböden) und das Spaltungsvermögen für d-Tartrat und Na-Citrat in Bacto-Pepton-Wasser nach Kauffmann (1934) bzw. in Trypton-Wasser nach Silberstein wurde nebenher durchgeführt.

In Nährböden, die spaltbare Kohlehydrate nicht enthielten, trat die Alkali-Bildung der Bakterien deutlich hervor. H_2S-Bildung erfolgte auf dem Bismutylnitrat-Agar, den Rommerskirchen (1951) angegeben hat. Indol-Bildung wurde in der üblichen trypsin-verdauten Bouillon (Indikator nach Kovacs) untersucht (Hallmann 1950). Außerdem wurden in allen Versuchen Bromthymolblau-Lactose-Agarplatten zur Prüfung der Kulturen auf Verunreinigung beschickt.

Nebenher wurde das Dissoziations-Vermögen der Stämme in Serum-Wasser (Ri-Serum 1 Teil zu Aqua dest. 4 Teile) bzw. auf Agar-Nährböden mit 10% Serum (Pferde-, Rinder-, Hammel-) oder mit 0,5% Glycerin untersucht.

b) Versuchsanordnung

Die verwendeten Nährböden wurden auf ihre Keimfreiheit geprüft (24 Stunden Brutschrank). Die Ausgangskulturen wurden während der Versuche in

regelmäßigem Abstand auf Reinheit kontrolliert (Platten-Kulturen). Das Grundsubstrat wurde stets auf Freisein von vergärbaren Substanzen untersucht („Kontrolle 1"). In den Versuchs-Nährböden auftretende Verunreinigungen wurden auf festen Nährböden unmittelbar erkannt, in flüssigen Nährböden gesondert durch Abimpfung auf Agarplatten sichergestellt. Ferner wurde in jedem Versuch eine Prüfung der Stammkulturen auf Indolbildung (nach Kovacs) vorgenommen.

Zur Gewinnung gleichmäßigen Einsaat-Materials wurde von 24 Stunden alten Agarkulturen eine Oese des Kulturbelages in 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgeschüttelt und je Röhrchen 1 Tropfen dieser Aufschwemmung verabfolgt.

Die flüssigen Nährböden wurden 14 Tage lang bebrütet; Farbumschlag des Indikators bzw. Gasansammlung wurden am 1., 2., 3., 4., 5., 7. und 14. Tag abgelesen. Als „Kontrolle 2" wurde stets ein unbeimpftes Röhrchen in jeder Reihe mitgeführt. Abweichende Ergebnisse wurden stets nachgeprüft (Kultur-Ausstrich, Färbung).

Auf den in Petrischalen ausgegossenen festen Nährböden wurde je 1 Oese Kultur-Aufschwemmung gleichmäßig ausgestrichen und je 2 Tage bei 37° C und bei Zimmertemperatur bebrütet. Auf der Agarplatte konnten die Kolonie-Formen (Platten-Mikroskop in auf- und durchfallendem Licht) sowie die biologischen Eigenschaften (Kohlehydrat-Spaltung) jeder einzelnen Kolonie festgestellt werden.

c) Versuchsreihen

Von den angesetzten Versuchen sind die Nummern 6, 17, 18, 19 und 21 ergebnislos verlaufen. In Nr. 6 wurde ein aus Pferdefleisch hergestelltes Trypton-Degistat verwendet, das Kohlehydrate enthielt; Versuch 17 betraf das Verhalten zu d-Tartrat und Na-Citrat, die Versuche 18 und 19 den Hohnschen Ammon-Agar und 21 die Lackmus-Molke. Diese Versuche bleiben künftig unerwähnt.

Die übrigen Versuchsreihen sind aus folgender Übersicht zu erkennen:

1. Die Vergärung aller oben angeführten Kohlehydrate
   a) in Pepton / Brunnengräber-Wasser (Versuch 1, 2)
   b) in Trypto-Pepton/Merck-Wasser (Versuch 3—5)
   c) in Serum (Pferd bzw. Rind)-Wasser (Versuch 7—8).
2. Die Vergärung von Dulzit und Mannit in Trypto-Pepton/Merck-Agar (Versuch 9).
   Die Vergärung von Maltose in Trypto-Pepton/Merck-Agar (Versuch 10—14).
   Die Vergärung von Maltose in Trypto-Pepton-Wasser (Versuch 15—16).
3. Die H_2S-Bildung (Versuch 20).
4. Die Reduktion von Indikatoren (Versuch 9, 22).
5. Die Morphologie der Kolonie (Versuch 9, 23).
6. Die Dissoziation auf erstarrtem Rinder-Serum, Pferd-, Rind-, Schaf-Serum-Agar und Glyzerin-Agar (Versuch 24).

Ergänzend ist noch zu erwähnen, daß die Versuche 1 und 15 in 2 Reihen (a und b) durchgeführt wurden. Im Versuch 1 wurde jedes Röhrchen mit 1 Tropfen Kulturaufschwemmung (a) bzw. mit je 1 Einzelkolonie (b) beimpft, im Versuch 15 mit Maltose-Lösungen versehen, die durch Erhitzung (a) bzw. Filtration (b) entkeimt waren. Der Versuch 16 diente dem Zweck, den Umfang kleiner Versuchsfehler zu ermitteln. Es wurden je 10 Kulturröhrchen gleicher Herstellung gleichmäßig und gleichzeitig infiziert und anschließend bebrütet. Die Ergebnisse seien hier vorausgenommen, weil sie für die Beurteilung der

Hauptergebnisse bedeutungsvoll sein können. Im allgemeinen wurden stammweise einheitliche Resultate erzielt. Grundsätzliche Unterschiede betrafen die Stämme 4780 und 1161, die sich im großen und ganzen maltose-negativ verhielten, jedoch in 3 bzw. 2 Röhrchen nach 4—5tägiger Verzögerung Maltose zerlegten. Schwache Vergärung (Indikator olivgrün) in allen Röhrchen zeigte Stamm 278/51, in je einem Röhrchen die Stämme 244 und 411.

3. Die Untersuchungsergebnisse

Die Ergebnisse der Gär-Versuche sind in beifolgender Tabelle zusammengestellt. Daraus geht hervor, in welchem Umfange Säure- und Gasbildung aufgetreten ist. Soweit eine Zuckerart nicht in allen Versuchen gespalten wurde, sind diese Versuchs-Nummern in Klammern angegeben. Hierbei genügte es, diese Angaben nur unter der Rubrik „Säure" zu machen, da Gasbildung stets nur in Verbindung mit Säurebildung auftrat.

Gleichmäßig wurden von allen Stämmen unter Säurebildung gespalten: Glucose, Dulzit, Mannit, Arabinose, Rhamnose. Geringe zeitliche Unregelmäßigkeiten traten bei Sorbit auf, während Maltose und Dextrin außergewöhnliche Schwankungen in der Vergärbarkeit aufwiesen. Von den erstgenannten Kohlehydraten werden Glucose, Dulzit, Mannit und Arabinose sehr schnell und kräftig vergoren. Die größte Säuremenge wurde aus Glucose und Mannit gebildet.

Die Spaltung von Maltose wechselt, wie aus der Tabelle ersichtlich, ziemlich stark. In noch höherem Maße tritt dies bei Dextrin hervor; ausdrücklich sei betont, daß stets das gleiche Dextrin-Präparat (Merck) verwendet wurde und die benutzten Nährböden aller Versuche aus einer Herstellung stammten. Die hierbei verzeichneten Unterschiede sind demnach nur in den Stämmen zu suchen, die in verschiedenem Maße Dextrin spaltende Fermente erzeugen. Ganz allgemein wurde Dextrin verzögert und schwach gespalten. Die Indikatoren zeigten zumeist nur vorübergehend Säure an und schlugen später nach der alkalischen Seite um. — Abgesehen davon, daß es nicht möglich ist, mittels der Spaltung der genannten Kohlehydrate eine sichere Trennung der verwendeten Stämme durchzuführen, geht der Gehalt der Stämme an Antigen XII_2 nicht parallel mit der Vergärung dieser Zucker und Alkohole.

Die bisherigen Ergebnisse betrafen nur die Säurebildung der einzelnen Stämme. Gasbildung aus vergärbaren Kohlehydraten ist, wie aus der Tabelle ersichtlich, einheitlich den XII_2-reichen Stämmen eigen und geht den XII_2-armen Stämmen völlig ab. Dieser Unterschied tritt mit Ausnahme des XII_2-reichen Stammes 1165 gleichmäßig auf. Von geringerer Bedeutung ist das Fehlen einer Gasbildung aus Dextrin und Rhamnose trotz Säurebildung. XII_2-reiche Stämme bilden bei der Vergärung leicht und regelmäßig spaltbarer Kohlehydrate stets, XII_2-arme Stämme niemals Gas.

Bei besonders starker Gasbildung (Stamm 364, 399, 274/51) wurde der Indikator entfärbt.

Das wechselnde Verhalten des Stammes 1165 hinsichtlich der Gasbildung tritt bei allen vergärbaren Kohlehydraten hervor: aus Sorbit wurde in 4, aus Glucose in 3, aus Mannit und Dulzit in 2 Versuchen, aus Maltose in 1, aus Arabinose und — wie bei allen Stämmen — aus Dextrin und Rhamnose in keinem Versuch Gas gebildet.

Bemerkenswert ist ferner, daß die XII_2-reichen Stämme stärkere Alkali-Bildner sind als die XII_2-armen, was vermutlich auf eine größere, allgemeine Vitalität hinweist. In Gär-Röhrchen mit den nicht spaltbaren Kohlehydraten Lactose und Xylose tritt dies zumeist schon nach 24 Stunden und um 2 Tage zeitiger als bei den XII_2-armen Stämmen auf. Hierbei verhielt sich der Stamm 1165 ähnlich wie die XII_2-armen Stämme.

Gär-Versuche: Nr. 1—8 mit allen Kohlehydraten
Nr. 9 mit Dulzit und Mannit
Nr. 10—16 mit Maltose

Stämme				Glucose		Lactose		Mannit		Dulzit		Sorbit		Arabinose		Rhamnose		Xylose		Maltose		Dextrin	
Serotyp	Bezeichnung	Herkunft: Träger	Herkunft: Tag der Isolierung	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S	G	S (excl.)	G	S (excl.)	G
XII_2-arm	21	?		+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+	—	+ (2, 8)	—
	244	Küken†	23. 3. 48	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+ (1b, 4, 8, 14, 15a)	—	+ (1b, 2, 4, 8)	—
	411	Küken†	10. 7. 49	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+ (1b, 7, 14)	—	+ (1b, 2—4, 7, 8)	—
	1575	Henne	24. 11. 50	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+	—	+ (2, 8)	—
	4780	Henne	8. 11. 50	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+ (1b, 10, 14, 16)	—	+ (1b, 2, 4)	—
	270/51	Küken†	10. 5. 51	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+ (1b, 14)	—	+ (1b, 2)	—
	278/51	Küken†	17. 5. 51	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+ (1b, 2, 4, 14, 15a)	—	+ (1b, 2, 4, 7, 8)	—
XII_2-reich	52	?		+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+ (2, 8, 15b)	+	+ (1b, 2—4, 7, 8)	—
	364	Küken†	23. 6. 49	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+ (1b, 7, 14)	+	—	—
	399	Henne†	7. 7. 49	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+ (2—4, 8)	—
	1161	Hahn†	29. 11. 50	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+ (1b, 4, 10, 12, 14, 15ab, 16)	+	—	—
	1165	Hahn†	4. 11. 50	+	(+)	—	—	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	—	+	—	—	—	+ (1b, 14, 15b)	(+)	+ (1b, 2—4, 7, 8)	—
	274/51 S	Henne†	15. 5. 51	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+ (1ab, 4, 10—15ab, 16)	+	—	—
	274/51 R	Henne†	15. 5. 51	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+ (1ab, 2, 4, 10—15ab, 16)	+	—	—
	430/51	Küken†	26. 6. 51	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+ (1ab, 2, 7, 10—15b, 16)	+	—	—

Zeichen-Erklärung:

S = Säure
G = Gas
\+ = positiv
— = negativ
(+) = wechselndes Verhalten
excl. = exclusive Versuch Nr. ...
† = Tiere sind verendet

Die Maltose-Vergärung auf Trypto-Pepton(Merck)-Agarplatten gab Aufschluß über die Ursachen der wechselnden Resultate in flüssigen Nährböden. Bei Aussaat von etwa 4 Wochen alten Schrägagar- oder Tryptonbouillon-Kulturen der Versuchsstämme, die bisher nur serologisch auf ihren Gehalt an Antigen XII_2 untersucht waren, wurde festgestellt, daß einige Kolonien dieses Disaccharid kräftig, andere nur schwach oder gar nicht spalteten. Diese 3 Kolonietypen wurden getrennt auf Maltose-Agarplatten mit dem Ergebnis ausgestrichen, daß bei starken und schwachen Vergärern wiederum Kolonien mit kräftiger, schwacher und fehlender Maltose-Spaltung auftraten, während die Nachkommen von Nichtspaltern nur maltose-negative Kolonien erzeugten. Nach erneutem getrenntem Abstrich maltose-positiver, -fraglicher und -negativer Kolonien wurde das gleiche Ergebnis erzielt, so daß 3 Generationen kräftiger, schwacher und Nichtspalter selektiv auf Maltose-Agar fortgeführt wurden (Versuch 13).

Im Einzelnen traten in der ersten Generation bei den Stämmen 4780, 274/51 S und R, 430/51 ausschließlich Nichtspalter auf, die sich in den folgenden Generationen konstant als maltose-negativ erwiesen.

Starke Säurebildner waren in der 1. Generation die Stämme 21, 1575, 399, bei denen schwache Säurebildner bereits auftraten, Nichtspalter jedoch völlig fehlten. In der 2. Generation erwiesen sich die starken Maltosespalter wiederum überwiegend als starke, in geringem Maße als schwache Maltose-Vergärer. In der 3. Generation wurden Abstriche der starken Maltosespalter erneut als kräftige, bei Stamm 399 überdies auch schwache Vergärer festgestellt. — Die schwachen Maltosespalter dieser 3 Stämme ließen in der 2. Generation Maltosespalter und -nichtspalter auftreten, wobei im allgemeinen die Nichtspalter überwogen. In der 3. Generation gingen auch diese schwachen Maltose-Vergärer restlos in Nichtspalter über.

Die restlichen Stämme ließen in der 1. Generation zumeist alle 3 'Typen' erkennen. In den beiden folgenden Generationen waren bei den Stämmen 244, 411 die Kolonien aller Abstriche maltose-negativ. Im übrigen traten in der 2. Generation bei den maltose-positiven Dissozianten nur maltose-positive (Stamm 270/51, 52, 1161) oder maltose-positive und -negative (278/51) Kolonien auf. In der 3. Generation waren endlich Maltose-Spalter nur noch bei Stamm 21, 1575, 270/51, 278/51, 52, 364, 399, 1165 zugegen. Die Nachkommen der maltose-schwachen Kolonie-Typen waren bis auf Stamm 399 völlig maltose-negativ geworden.

Wurde andererseits von Kulturen ausgegangen, die 10—12mal nacheinander über Serum-Agar (siehe unter Dissoziations-Versuche (Versuch 24)!) gezüchtet worden waren, so ergaben die Ausstriche auf Maltose-Agar (Versuch 14) nur maltose-negative Dissozianten bei allen Stämmen, ausgenommen 21, 1575, 399, die in starke und schwache Säurebildner aufspalteten. Während erstere in der 2. Generation sich ebenso verhielten, traten nunmehr bei den letzteren auch maltose-negative Kolonien auf. Maltose-Nichtspalter behielten diese Eigenschaft auch in der nächsten Generation stets bei.

Aus dem Gesagten ergibt sich eine deutliche Tendenz in der Richtung, daß die Fähigkeit zur Maltose-Spaltung bei Weiterzüchtung auf gehaltreichen Nährböden (Serum) eingebüßt wird.

Kolonie-morphologische Unterschiede zwischen maltose-positiven und maltose-negativen Dissozianten eines Stammes bestanden bei 24—48 Stunden alten Kulturen nicht. Erst auf 3—4—6 Tage alten Platten wurden Säurebildner in ihrem Zentrum rauh und höckerig, ringförmig umschlossen von dem glatten, gewölbten Rand. Diese Kolonien entsprachen der „kolonie-morphologischen Variante von Salmonella paratyphi B", die Bader (1949) in seiner Arbeit auf Seite 273 abgebildet hat. Nichtspalter blieben oberflächlich

glatt und feucht spiegelnd. Bemerkenswert ist noch, daß die Maltose-Spalter des Stammes 52 nach 24 Stunden Bebrütung bei Zimmer-Temperatur in 4 bis 6 Stunden schwarzbraune Schleimwall-Bildung zeigten und alkalisch wurden.

Anhangsweise sei kurz erwähnt, daß bei den Untersuchungen stets auf S- und R-Form der Kulturen geachtet wurde und daß das Bestreben dahin ging, eine möglichst reine S-Form heranzuzüchten. Es war festgestellt worden, daß in den Ausgangs-Kulturen meist Übergangsformen mit der Neigung zur R-Form, einwandfreie S-Formen jedoch selten vorkamen (Versuch 9, 23).

Zur Züchtung einer reinen S-Form wurden die Stämme täglich an 7 aufeinanderfolgenden Tagen auf geronnenem Rinder-Serum umgestochen und der Ausstrich von der 7. Generation auf Bromthymolblau-Laktose-Agar bebrütet. Die aufgegangenen Kolonien waren nach 48 Stunden ähnlich den Ausgangs-Kulturen vorwiegend Übergangsformen, jedoch mit geringer Neigung zu S-Form (Versuch 24).

Von der letzten Generation wurden gleichzeitig Ausstriche auf Pferde-, Rinder-, Hammel-Serum-Agar und Glyzerin-Agar in täglichen Abstrichen auf die gleichen Nährböden 7mal weiterverimpft, wobei stets die S-Form-ähnlichen Kolonien übertragen wurden. Bei der Prüfung der 7. Generation auf Bromthymolblau-Lactose-Agar wurde festgestellt, daß etwa die Hälfte der aufgegangenen Kolonien bei allen Stämmen außer 4780, 364 S-Formen waren und der Rest zu den Übergangsformen gehörte. Zu letzteren sind auch feuchtwachsende Formen mit Ausläufern zu rechnen. Stamm 4780 zeigte in allen, 364 in den ersten Generationen vorzüglich R-Form mit nur ganz geringer Neigung zur Übergangsform.

In einem Abstand von 8 Tagen wurden, von der letzten Generation ausgehend, die gleichen Nährböden beschickt und jeweils nach 3tägiger Bebrütung in 4 Generationen weiterverimpft. In der letzten Generation ging dann — wiederum geprüft auf der Bromthymolblau-Lactose-Platte — $^4/_5$ S-Formen, der Rest Übergangsformen, auf. Stamm 4780 verharrte in der R-Form, die Kolonien erfuhren lediglich eine annähernde Abrundung.

Durch öftere Passagen ist es möglich, die Anzahl der S-Formen zu erhöhen, ohne jedoch reine S-Stämme zu erreichen. Bei diesen Passagen erwies sich Rinder- und Hammel-Serum günstiger gegenüber Pferde-Serum; ein Glyzerin-Zusatz hat jedoch nur vorübergehend in den 1. Passagen das Auftreten von S-Formen hervorgerufen. Nährböden mit 1,5% Agar sind 2%igen vorzuziehen; besonders der Trypto-Pepton(Merck)-Nährboden mit 1,5% Agar gewährt der S-Form vorzügliche Entwicklung, während derselbe Nährboden mit 2% Agar bei gleicher Ausgangskultur fast ausschließlich Übergangsformen entstehen ließ.

Die Virulenz der Stämme im Tier-Versuch wurde nicht geprüft.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Die Bildung von Säure aus Kohlehydraten durch die 14 Stämme der Salmonella gallinarum hat — namentlich bei Maltose und Dextrin — bestimmte Divergenzen erkennen lassen, die jedoch mit den serologischen Unterschieden — XII_2-arm bzw. XII_2-reich — nicht parallel gehen. Das wechselnde Vermögen, aus Kohlehydraten Säure abzuspalten, betrifft beide serologische Gruppen. Dulzit wurde regelmäßig von allen Stämmen gespalten.

Das wechselnde Verhalten der Gallinarum-Stämme gegenüber Maltose wurde durch 3 Generationsfolgen hindurch untersucht, nachdem festgestellt worden war, daß Reinkulturen auf festen Nährböden Kolonien von kräftiger, schwacher und fehlender Maltose-Spaltung erzeugten. Danach unterliegt diese

Eigenschaft der Dissoziation. Aus Kolonien mit schwacher oder fehlender Maltose-Spaltung entstehen niemals Dissozianten mit starker Maltose-Vergärung. Starke Maltose-Spalter hingegen können diese Fähigkeit über mehrere Generationen beibehalten. Bei diesen Versuchen war ausgeschlossen worden, daß die Maltose-Spaltung durch die Gegenwart von Monosacchariden vorgetäuscht wird, da mit filtrierten Maltose-Lösungen dieselben Ergebnisse erzielt wurden.

Der Grundnährboden beeinflußt die Dissoziation in bestimmter Richtung. Kulturen auf optimalen Nährböden (Serum, Tryptopepton/Merck) zeigten nach dem Ausstrich auf Maltose-Platten eine steigende Tendenz zur Maltose-Nichtspaltung.

Auch bei Untersuchungen über die Maltose-Spaltung durch Salmonella typhosa haben Luz, Meding und Würzburger starke Schwankungen festgestellt; die deshalb erhobenen Zweifel an der Konstanz fermentativer Leistungen überhaupt (Bader 1949) sind nach meinen Untersuchungen nicht berechtigt.

War die Säurebildung aus Kohlehydraten durch die beiden Serotypen der Salmonella gallinarum unregelmäßig, so wurde die Gasbildung aus vergärbaren Kohlehydraten niemals bei XII_2-armen, aber stets bei XII_2-reichen Stämmen gefunden. Aus Rhamnose und Dextrin wurde jedoch niemals Gas abgespalten. Eine biologische Erklärung für diese Erscheinungen kann nicht gegeben werden. Nach Manninger (1927/28) besitzen gaslose Stämme eine erhöhte Virulenz.

Gelegentlich treten auch unter den Gasbildnern anderer Salmonella-Arten (Salmonella paratyphi B, Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis) überraschend gaslose Varianten auf (Bader 1949.).

Die stärkere „Alkali-Bildung" der XII_2-reichen Gruppe kann durch eine geringere Säurebildung vorgetäuscht sein oder tatsächlich auf stärkerer Spaltung N-haltiger Nährstoffe beruhen. Jedenfalls zeigt die XII_2-arme Gruppe intensive und rasch anlaufende Säurebildung aus Glucose, Mannit, Dulzit und Arabinose. Ausdrücklich sei darauf hingewiesen, daß Alkali- und Säurebildung stets nebeneinander verlaufen (Manninger 1927/28), so daß der Indikator nur den Säure-Überschuß, der über die Alkalität hinaus gebildet wird, anzeigt.

Während meiner Versuche wurde der Antigen-Aufbau der Stämme hinsichtlich Teilantigen XII_2 wiederholt geprüft; eine Änderung wurde nicht festgestellt. Es ist deshalb anzunehmen, daß eine Dissoziation dieser serologischen Eigenschaften nicht stattgefunden hat.

V. Zusammenfassung.

1. Salmonella gallinarum-pullorum hat einen quantitativ verschiedenen Antigen-Aufbau seines O-Antigens XII, so daß man XII_2-reiche und XII_2-arme Stämme unterscheidet.
2. Die XII_2-reichen Stämme bilden aus vergärbaren Kohlehydraten Gas (1 von 7 Stämmen unregelmäßig).
3. Die XII_2-armen Stämme bilden aus vergärbaren Kohlehydraten niemals Gas.
4. Alle Stämme bilden Säure aus Glucose, Mannit, Dulzit, Sorbit, Arabinose und Rhamnose; aber nicht aus Lactose und Xylose.
5. Maltose und Dextrin werden von den Stämmen beider Serogruppen teils gespalten, teils nicht angegriffen. Die Fähigkeit zur Säurebildung aus einem dieser beiden Kohlehydrate geht weder mit der Gasbildung noch mit dem

Gehalt der betreffenden Stämme an Antigen XII_2 parallel. Dissoziation hinsichtlich des Maltosespaltungs-Vermögens mit deutlicher Neigung zum Verlust dieser Eigenschaft wurde bei XII_2-armen wie XII_2-reichen Stämmen festgestellt.

VI. Schlußfolgerungen.

Die XII_2-armen Stämme von Salmonella gallinarum bilden aus vergärbaren Kohlehydraten niemals Gas, während XII_2-reiche Stämme dazu befähigt sind. Inwieweit auf Grund der Gasbildung ausgewählte Stämme stets XII_2-reich sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Fähigkeit, aus bestimmten Kohlehydraten Säure zu bilden, bietet keinen Hinweis auf den Gehalt dieser Stämme an Antigen XII_2.

Die Maltosespaltung der Stämme von Salmonella gallinarum ist durch Dissoziation erklärt und damit als inkonstant erwiesen. Damit entfallen die Gründe für eine auf dieser Eigenschaft beruhende Trennung in zwei verschiedene Arten. Das Art-Epitheton „pullorum“ muß als späteres Synonym dem älteren „gallinarum“ weichen.

Herrn Professor Dr. Roots danke ich ergebenst für die Überlassung des Themas und für sein Interesse an der Arbeit. Ferner sage ich Herrn Professor Dr. Haupt für seine stets bereite Unterstützung meinen aufrichtigen Dank.

VII. Literaturverzeichnis.

1. Almon and Stovall: Zit. nach Bader.
2. Bader: Die Typhus-Paratyphus-Enteritis-Gruppe (Die Salmonella-Gruppe). Ergebn. d. Hyg. **26**, 235 (1949).
3. Beller: Bacterielle Kücken-Ruhr (sog. weiße Ruhr) und ihre Beziehung zum Hühnertyphus. Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt **57**, 462 (1926).
4. Ders.: Zur Aetiologie des Kückensterbens. DTW **35**, 827 (1927).
5. Bergey's Manual of determinative Bacteriology 6th Ed., Baltimore (1948).
6. Carls: Die Herauszüchtung von Salmonella gallinarum (s. S. pullorum) aus blutpositiven Hühnern. In.-Diss. Gießen (1950).
7. Curtice: Zit. n. Klimmer und Haupt.
8. Dräger: Diagnostik der Bakterien der Salmonella-Gruppe. Academie-Verlag, Berlin (1951).
9. Edwards and Bruner: Form variation in Salmonella pullorum and its delation to X strains. Cornell vet. **36**, 318 (1946).
10. Edwards, Bruner, Doll and Hermann: Further Notes on variation in Salmonella pullorum. Cornell vet. **38**, 257 (1948).
11. Gressel: Vergleichende Untersuchungen über das Bacterium paradysenteriae (Bacterium gallinarum Klein, Bacterium sanguinarium Moore, Bacterium typhi gallinarum alcalifaciens Pfeiler und Rhese). DTW **35**, 267 (1927).
12. Ders.: Zur Differenzierung des Bacterium pullorum (Rettger) vom Bacterium paradysenteriae (Bacterium gallinarum Klein, Bacterium sanguinarium Moore, Bacterium typhi gallinarum alcalifaciens Pfeiler und Rhese). DTW **36**, 291 (1928).
13. Günther: Biologische Studien über das Bacterium pullorum und seine Beziehungen zum Bacterium paradysenteriae gallinarum. In.-Diss. Hannover (1930).
14. Hallmann: Bakteriologie und Serologie. Thieme-Verlag, Stuttgart (1950).
15. Haupt: Ein Beitrag zur kulturellen Unterscheidung des Pfeifferschen Pseudotuberkulose-Bazillus von ähnlichen vogelpathogenen Bakterienarten (Bact. avicidum und Bact. gallinarum). Zbl. f. Bakt. I, **109**, 1 (1928).
16. Ders.: Bacterium gallinarum Klein und Gallinarum-Bazillose. BTW **44**, 437 (1928).
17. Hohn und Herrmann: Der Kulturtyp der Erreger der Typhus-Paratyphus-Gruppe und seine Bedeutung für die Standort-Gebundenheit. Zschr. f. Hyg. **117**, 722 (1936).
18. John-Brooks and Rhodes: Zit. nach Haupt (1928).
19. Jones: Zit. nach Manninger, Lerche.
20. Jordan and Burrows: Textbook of Bacteriology 15th Ed., Philadelphia und London (1949).
21. Kauffmann: Die kulturelle Differenzial-Diagnose der Typhus-Paratyphus-Gruppe. Zschr. f. Hyg. **111**, 247 (1930).
22. Ders.: Untersuchungen über die Duisburger Gallinarum-Stämme. Zbl. f. Bakt. I, **132**, 337 (1934).
23. Ders.: Zbl. f. Bakt. **41**, 127 (1940) zit. nach Edwards and Bruner (1946).
24. Klein: Über eine epidemische Krankheit der Hühner, verursacht durch einen Bazillus — Bacterium gallinarum. Zbl. f. Bakt. I, **5**, 689 (1889).

25. Klimmer und Haupt: Über Infektion von Hühnern mit dem Bacterium gallinarum Klein (1889). Zbl. f. Bakt. I, **105**, 99 (1927/28).
26. Leinbrock: Über den N- und C-Stoffwechsel der Bakterien der Coli-, Typhus-, Paratyphus-, Enteritis- und Ruhr-Gruppe. Ergebn. d. Hyg. **25**, 26 (1949).
27. Lerche: Die bakterielle weiße Ruhr der Küken. Zschr. f. Inf. Krkh. d. Haust. **35**, 139 (1929).
28. Lignières und Zabala: Zit. nach Manninger.
29. Manninger: Untersuchungen über Küken-Ruhr und Hühnertyphus. Zschr. f. Inf. Krkh. d. Haust. **32**, 265 (1928).
30. Miessner: Paratyphus und Paradysenterie. DTW **35**, 149 (1927).
31. Moore: Zit. n. Manninger.
32. Mulsow: Zit. n. Klimmer und Haupt.
33. Pfeiler: Identitäts-Nachweis für den Erreger des Kleinschen Hühnertyphus und des Pfeiler-Rheseschen Hühnertyphus-Bazillus. Zbl. f. Bakt. I, **85**, 193 (1921).
34. Pfeiler und Rhese: Zit. n. Manninger.
35. Rettger und Mitarbeiter: Zit. n. Beller, Manninger, Klimmer und Haupt, Lerche.
36. Roekel: Progress of Pullorum-Disease. (J. am. vet. med. Ass. **115** (1949) p. 475.) Ref.: Die Veterinär-Medizin, 452 (1949).
37. Rommerskirchen: Der Nachweis von H_2S in Bakterien-Kulturen. In.-Diss. Gießen (1951).
38. Silberstein: Zit. n. Dräger.
39. Smith and Ten Broeck: Zit. n. Klimmer und Haupt.
40. Wright and Edwards: The serologic differentiation of Salmonella pullorum forms. (Vet. Res. **9** (1948), p. 386.) Ref.: Die Veterinär-Medizin, 281 (1948).
41. Wynohradnik: Bacterium gallinarum und Bacterium pullorum. DTW **48**, 61 (1940).
42. Younie: Zit. nach Roekel.

Lebenslauf.

Am 10. März 1916 wurde ich in Egenroth, Kreis Untertaunus, geboren.

Nach 8jährigem Volksschul- und 5jährigem Oberschul-Besuch studierte ich in Weilburg Pädagogik und in Gießen Veterinär-Medizin. Im Juli 1951 bestand ich in Gießen die tierärztliche Prüfung. Nach abgeleisteter Praktikantenzeit wurde mir im Februar 1952 die Approbation erteilt.

Mit den Arbeiten für die vorliegende Dissertation habe ich im August 1951 begonnen.